昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2008，51(6)：561 – 568　　ISSN 0454-6296

家蚕拟抗微生物肽 Gloverins 基因(*Bmglv*)的原核表达及抗菌活性鉴定

韩　冬[1,2]，邓小娟[1]，杨婉莹[1,*]，叶明强[1]，曹　方[1]，黄亚东[3]，温硕洋[4]，曹　阳[1]，夏庆友[5]

(1. 华南农业大学动物科学学院蚕丝科学系，广州　510642； 2. 枣庄市农业局，山东枣庄　277800；3. 暨南大学医药生物技术研究开发中心，广州　510632； 4. 华南农业大学资源与环境学院昆虫学系，广州　510642；5. 西南大学农业部蚕桑学重点实验室，重庆　400716)

摘要：家蚕 *Bombyx mori* 基因组全测序于 2004 年完成后，由家蚕基因组注释发现了 35 条拟抗微生物肽基因序列。本研究选取其中的 5 条 Gloverins 同系物(isoforms)基因(*BmglvB*，*BmglvA*2，*BmglvA*3，*BmglvA*5 和 *BmglvA*6)，克隆至 pET-21d 载体，转化 *Escherichia coli* Rosetta™(DE3)宿主菌进行表达；克隆表达的 5 个家蚕 Gloverins 同系物基因大部分以可溶形式表达，经 Ni-NTA 亲和层析纯化和 Sephadex G-10 脱盐处理后，采用平板孔穴抑菌法测定其抗菌活性。结果表明：注释发现的 5 条家蚕拟抗微生物肽 Gloverins 同系物基因，具有与在其他昆虫中已鉴定报道的 Gloverin 相似的抗革兰氏阴性细菌的功能，实验确认了它们就是家蚕 Gloverins 抗微生物肽基因。

关键词：家蚕；抗微生物肽；Gloverin；原核表达；抗菌活性

中图分类号：S881.2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)06-0561-08

Prokaryotic expression and activity detection of the gloverin-like genes (*Bmglv*) of *Bombyx mori*

HAN Dong[1,2]，DENG Xiao-Juan[1]，YANG Wan-Ying[1,*]，CAO Fang[1]，HUANG Ya-Dong[3]，WEN Shuo-Yang[4]，CAO Yang[1]，XIA Qing-You[5] (1. Department of Sericulture Science，College of Animal Science，South China of Agricultural University，Guangzhou 510642，China；2. Zaozhuang City Agricultural Bureau，Zaozhuang，Shandong 277800，China；3. Biopharmaceutical Research and Development Center，Jinan University，Guangzhou 510632，China；4. Department of Entomology，College of Natural Resources and Environment，South China Agricultural University，Guangzhou 510642，China；5. Key Sericultural Laboratory of Agriculture Ministry，College of Sericulture and Biotechnology，Southwest University，Chongqing 400716，China)

Abstract：Thirty-five members of the gene family in seven gene families have been discovered from silkworm genome by the bioinformatics analysis after draft map of silkworm genome had been completed in 2004，of which seven pieces belong to gloverin gene families. In this study，five silkworm gloverin-like genes，namely *BmglvB*，*BmglvA*2，*BmglvA*3，*BmglvA*5 and *BmglvA*6，were cloned and expressed in the pET-21d expression vector/*Escherichia coli* Rosetta™(DE3). The expressed products of gloverin-like gene family were purified successfully by the Ni-NTA affinity chromatography and desalted by Sephadex G-10 chromatography under native conditions，respectively. By use of agarose diffusion assay，the antimicrobial activity of the gloverin-like genes was defined. The results showed that the five silkworm gloverin-like genes had the similar activity to Gram-negative bacterial as reported in other insects，and the five gloverin-like peptides were confiremed as new antimicrobial peptides.

Key words：*Bombyx mori*；antibacterial peptide；gloverin；prakaryotic expression；antibacterial activity

基金项目：国家重点基础研究发展规划("973"计划)项目(2005CB121000)；国家高技术研究发展计划("863"计划)重大专项(2006AA10A119)；广东省科学技术计划重点项目(2003C104042)；广东省自然科学基金资助项目(032256，04020553)

作者简介：韩冬，男，1978 年 11 月生，硕士，从事昆虫生化与分子生物学研究，E-mail：handong789@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：emilyywy@scau.edu.cn

收稿日期 Received：2007-12-20；接受日期 Accepted：2008-05-12

自从 20 世纪 70 年代瑞典科学家 Boman 等用 *Escherichia coli* 诱导惜古比天蚕 *Hyalophora cecropia* 分离得到第一种抗微生物肽 Cecropin 之后，大量的抗微生物肽被陆续发现，仅来源于昆虫的抗微生物肽就有 200 多种。目前所发现的抗微生物肽有很多种对细菌、真菌、病毒以及肿瘤细胞都有不同程度的抑制作用，而且不会导致微生物产生耐药性，不破坏人体的正常细胞，这在抗生素日益泛滥的今天，其优点受到人们的广泛关注，已成为目前生物药物开发研究中的一个热点。

2004 年家蚕 *Bombyx mori* 基因组全测序和框图绘制完成（向仲怀，2003，2004；Xia *et al*.，2004），利用家蚕基因组全序列数据、框图数据和 EST 数据，运用生物信息学方法，由家蚕基因组共注释发现了 35 条拟抗微生物肽基因序列，经过整理分析，发现这 35 条基因序列实际上为 6 种抗微生物肽同系物（isoforms）基因序列，即 Moricins（12 条同系物），Attacins（2 条同系物），Enbocins（2 条同系物），Cecropins（11 条同系物），Lebocins（1）和 Gloverins（7 条同系物），其中 Gloverins 为在家蚕基因组中新注释发现的抗微生物肽同系物基因。这些拟抗微生物肽序列是否具有抗菌活性，需要通过生物学实验才能确认。

Gloverins 是一类新发现的昆虫抗细菌肽，最初是由 Axen 等（1997）在惜古比天蚕 *H. cecropia* 蛹中发现，由 130 个氨基酸组成，富含碱性甘氨酸（Gly），对革兰氏阴性菌有极强的杀灭作用，在浓度为 1～3 μmol/L 时就能抑制大肠杆菌的生长。其后在鳞翅目的其他几种昆虫如棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Mackintosh *et al*.，1998）、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*（Lundström *et al*.，2002）、烟草天蛾 *Manduca sexta*（Zhu *et al*.，1995）、和大蜡螟 *Galleria mellonella*（Seitz *et al*.，2003）中也发现了相似性很高的 Gloverins 抗细菌肽因子。另外，由于天蚕 Gloverin 对革兰氏阴性菌有极强的杀灭作用，国内 2005 年已有在原核中表达的报道（许波等，2005），但至今还没有关于家蚕 Gloverin 的文献报道，只有在日本的家蚕基因组 NCBI 数据库中登录的 4 条 Gloverin-like 序列（BAD51476.1，BAD51475.1，BAD51474.1，BAD51473.1）。根据已鉴定的同族的另一类富含甘氨酸的抗细菌肽 Attacins 的抗菌机理推测，Gloverins 的抗菌机制可能为通过抑制细菌外膜蛋白的合成而达到抑菌的作用（Yamakawa and Tanaka，1999）。

本文研究的目的是鉴定家蚕 Gloverins 同系物的抗菌功能。Cheng 等（2006）将 7 条家蚕 Gloverins 基因（*Bmglv*）序列分别命名为 *BmglvB*，*BmglvA1*，*BmglvA2*，*BmglvA3*，*BmglvA4*，*BmglvA5* 和 *BmglvA6*，其对应的同系物蛋白 Bmglv 分别为：BmglvB，BmglvA1，BmglvA2，BmglvA3，BmglvA4，BmglvA5 和 BmglvA6。生物信息学比对分析发现 *BmglvA1* 和 *BmglvA4* 是 *BmglvA2* 中的一部分，因此本文选择 *BmglvB*（Bmb027709），*BmglvA2*（Bmb029116），*BmglvA3*（Bmb031966），*BmglvA5*（Bmb006180）和 *BmglvA6*（Bmb012754）5 条家蚕 Gloverins 同系物基因进行克隆表达和抗菌活性的初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

供试家蚕 *Bombyx mori* 为大造品种，由广东省农业科学院吴福泉研究员提供。

表达质粒载体 pET-21d、表达宿主菌 *E. coli* Rosetta™（DE3）、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠杆菌 *E. coli* $K_{12}D_{31}$、灵菌败血菌 *Serratia marcescens* Bizic 和绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由本实验室保存。

TRIzol Reagent 为 Invitrogen 公司产品，His·Tag Monoclonal Antibody 为 Novagen 公司产品，羊抗鼠辣根过氧化物酶（HRP）标记的 IgG 抗体购自上海华美公司，DNA Marker 均为北京天为时代科技有限公司产品。

1.2 家蚕总 RNA 的提取

取化蛹第 4 天的家蚕蛹脂肪体，用无 RNA 酶的 DEPC 水洗干净，按 50～100 mg 组织/mL TRIzol Reagent 加入 TRIzol Reagent，室温放置 5 min，使其充分裂解；12 000 r/min 离心 5 min，弃沉淀，按 200 μL 氯仿/mL TRIzol Reagent 加入氯仿，振荡混匀室温放置 15 min 后，4℃、12 000 r/min 离心 15 min，吸取上层水相至另一离心管中，按 0.5 mL 异丙醇/mL TRIzol Reagent 加入异丙醇混匀，室温放置 5～10 min；4℃，12 000 r/min 离心 10 min，弃上清，按 1 mL 75%乙醇/mL TRIzol Reagent 加入 75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀；4℃，8 000 r/min 离心 10 min，尽量弃上清，风干，直至乙醇挥发殆尽，用 30～80 μL DEPC 水溶解沉淀，－80℃保存备用。

1.3 家蚕拟 Gloverins 基因的克隆

1.3.1 cDNA 第一链的合成：按照 TOYOBO 公司 M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒使用说明书进行。在

无 RNAase 的 1.5 mL Eppendorf 管中加入下列各物质：M-MLV Reverse Transcriptase（20 U/μL）1 μL，5 × Reaction Buffer 4 μL，oligo（dT）$_{20}$（10 μmol/L）1 μL，Ribonuclease Inhibitor（40 U/μL）1 μL，dNTP mix（10 mmol/L each）2 μL，Total RNA 1 μL，DEPC-treated water 10 μL，总体积 20 μL。将其混匀后，置于 42℃水浴 40 min，99℃处理 5 min，4℃冷却后，瞬时离心，储存于 –20℃备用。

1.3.2　引物设计及 PCR 扩增：将 5 条家蚕 Gloverins 同系物的氨基酸序列进行比对分析，发现 BmglvA2 和 BmglvA3 的 N 端没有氨基酸差异，根据其核苷酸序列设计一条简并引物 *BmglvA*2/*A*3；除 BmglvB 外，其他 4 条序列的 C 端相似性较高，将 *BmglvA*2，*BmglvA*3，*BmglvA*5 和 *BmglvA*6 的下游设计一条简并引物 *Bmglv*-2；*BmglvB* 序列的特异上下游引物为 *BmglvB*-1 和 *BmglvB*-2 斜体部分为保护碱基，下划线部分为 *Nco* Ⅰ 酶切位点，阴影部分为 *Xho* Ⅰ 酶切位点。

*BmglvA*2/*A*3：5′-*GTAA*CCATGGTTTATTCGGAGTACGAAGAAGGATATCCA（A/G）TTAG-3′

*BmglvA*5-1：5′-*GCGCG*CCATGGTATACAGGTCTTCTGATTATG-3′

*BmglvA*6-1：5′-*CATG*CCATGGTTTACGGACCTTCTGATTACG-3′

BmglvB-1：5′-*CGAA*CCATGGTTTCTATGCCTCCTGGTTACGC-3′

BmglvB-2：5′-*GCAAGGCCA* CTCGAGCCACTCGTGAGTAATCTG-3′

Bmglv-2：5′-*AAA* CTCGAGCCA（A/C）TCATG（G/C）CGGA（A/T）CTCTG-3′

用 PCR 方法从反转录得到的家蚕 cDNA 第一链扩增出两端含有 *Nco* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 位点的 5 条家蚕 Gloverins 目的基因。PCR 反应体系为：10 × Buffer（含 Mg^{2+}）5 μL，4 × dNTPs（2.5 mmol/L）4 μL，Upstream primer（10 μmol/L）2 μL，Downstream primer（10 μmol/L）2 μL，cDNA First-strand 1 μL，Taq（0.5 U/μL）5 μL，ddH_2O 31 μL，总体积 50 μL。PCR 反应参数为：94℃ × 5 min→（94℃ × 1 min→50 ~ 55℃ × 30 s→72℃ × 1 min）× 30 cycles→72℃ × 10 min→4℃ × ∞。

1.3.3　PCR 产物的克隆、测序鉴定：PCR 产物的回收、目的基因和质粒 pET-21d 的酶切与连接以及连接产物转化 *E. coli* Rosetta™（DE3）宿主菌均按照文献（萨姆布鲁克 J 等，1992）进行。将初步鉴定为阳性的转化子送至上海生物工程有限公司进行测序。获得重组质粒 pET-21d-*BmglvB*，pET-21d-*BmglvA*2，pET-21d-*BmglvA*3，pET-21d-*BmglvA*5 和 pET-21d-*BmglvA*6。

1.4　家蚕 Gloverins 基因的表达及鉴定

分别从平板上挑取含重组质粒的 *E. coli* Rosetta™（DE3）宿主菌，接种于 3 mL 的 LB 液体培养基中（含 AMP 100 μg/mL），37℃、220 r/min 振荡培养过夜；然后按 2% 的体积转接于 10 mL LB 液体培养基中（含 AMP 100 μg/mL），37℃ 250 r/min 振摇培养 3 ~4 h，使其 OD_{600} 分别达到 0.2，0.3，0.4，0.5，0.6，0.8，1.0，1.2，1.4 时，加入 IPTG（终浓度为 1.0 mmol/L），诱导 5 h 后取样，进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳，检测诱导时菌液起始浓度对外源蛋白表达的影响。

按上述培养方法，使菌液的 OD_{600} 为 0.6 时，加入不同浓度的 IPTG，使其终浓度分别为 0.2，0.4，0.6，0.8，1.0，1.2，1.4，1.6，1.8 mmol/L，然后诱导 5 h 后取样进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳，检测 IPTG 浓度对外源蛋白表达的影响。

采用 Western blotting 方法检测目的基因在原核表达系统中的表达，按照常规方法（F. 奥斯伯等，1995）进行。

1.5　表达产物的可溶性分析

按上述确定的培养条件，对含重组质粒的 *E. coli* Rosetta™（DE3）宿主菌进行大量诱导，培养后，加入 1/30 培养液体积比例的 4℃预冷的裂解缓冲液（0.65 mol/L NaH_2PO_4，0.5 mol/L NaCl，10 μmol/L 咪唑，pH 8.0），悬浮菌体，冰浴 30 min 后超声处理（超声 30 min，每次 5 s，间隔 9 s，功率 800 W）至菌体完全破碎，在 4℃、10 000 r/m 离心 30 min，分别取上清和沉淀，进行 Tricine-SDS-PAGE 检测，对表达的抗菌肽 Gloverins 进行可溶性分析。

1.6　表达产物的分离纯化

对表达产物的纯化，参照 Qiagen 公司的 Ni-NTA Matric 操作手册进行。将含目的蛋白的细菌破碎液上样于 Ni-NTA 纯化柱，调整流速（≤1.5 mL/min）后，用裂解缓冲液、洗脱液（0.65 mol/L NaH_2PO_4，0.5 mol/L NaCl，40 μmol/L 咪唑，pH 8.0）和溶解缓冲液（0.65 mol/L NaH_2PO_4，0.5 mol/L NaCl，8% 咪唑，pH 8.0）洗脱柱子，取各个部分洗脱液 15 μL，进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测。

将上述经 Ni-NTA 层析纯化后的样品用 Sephadex G-10 层析介质进行脱盐处理，用 0.05 mol/L 的醋酸铵缓冲液洗脱 Sephadex G-10 层析柱，洗脱速

度为3 mL/min，收集洗脱峰。将经脱盐处理的蛋白样品冻干，将每个目的蛋白样品用无菌水调成终浓度200 μmoL/L，于-80℃保存备用。

1.7　家蚕 Gloverins 同系物的抗菌活性鉴定

首先采用平板孔穴抑菌法测定目的蛋白的抗菌生物活性（Hultmark *et al*.，1980）。在加入菌液的琼脂平板上打直径为2.7 mm的圆孔，分别在孔中加入已纯化的3 μmol/L样品（BmglvB，BmglvA2，BmglvA3，BmglvA5和BmglvA6）各10 μL，用无菌水10 μL作阴性对照。另外选用10 μL克拉红霉素（Clarithromycin，Cam）（34 μg/mL）作为本次抗性测定的阳性对照。加样后将平皿放入4℃冰箱10 h，让样品充分扩散到琼脂中，然后将平皿倒置于37℃过夜，次日观察结果。

2　结果与分析

2.1　家蚕 Gloverins 的序列分析

运用CLUSTAL X（1.8）（Thompson *et al*.，1997）软件将家蚕Gloverins同系物和文献报道的粉纹夜蛾*T. ni*的Gloverin序列进行比对分析，同时在Internet上运用信号肽分析软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）确定其成熟肽的位置。综合两种方法得出的5条家蚕Gloverins同系物BmglvB，BmglvA2，BmglvA3，BmglvA5和BmglvA6的成熟肽大小和位置一致，如图1所示。

```
                     10        20        30        40        50        60
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
BmglvA2      MNSKLLYFFATVLVCVNAEVY--SEYEEGYPISGQFSK--RHPRD----VTWDKQVGGGK
BmglvA3      MNSKLLYFFATVLVCVNAEVY--SEYEEGYPVSGQFSK--RHPRD----VTWDKQVGGGK
BmglvA5      MNSKLLFFIATVLVCVNAEVYRSSDYEKEYPIRGLFSK--RHPRD----VTWDTRMGGGK
BmglvA6      MNSNLFYIFATTLVCVNAEVYGPSDYAEDYSISGQSSR--RHPRD----VTWDKQMGGGK
BmglvB       MYSKVLLS-AALLVCVNAQVSMPPGYAEKYPITSQFSKSVRHPRDIHDFVTWDKEMGGGK
AAG44367.1   MQSSILLIFAAFVACTYAQVSLPPGYAQKYPQY-KYSKVARHPRD----TTWEHNVGRGK
             * *.::   *: :.*. *:*  .  * : *.    *:   *****    .**: .:* **
                     70        80        90       100       110       120
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
BmglvA2      KVFGTLGQNDDGLFGKAGYNREIFNDDRGKLTGQAYGTRVLGPAGDSTNYGGRLDWANKNA
BmglvA3      KVFGTLGQNDDGLFGKAGYNREIFNDDRGKLTGQAYGTRVLGPAGDSTNYGGRLDWANKNA
BmglvA5      KVFGTLGQNDDGLFGKAGYNREIFNDDRGQLTGQAYGTRVLGPGGDSTNYGGRLDWANKNA
BmglvA6      KVFGTLGQNDDGLFGKAGYNKEIFNDDRGKLTGQAYGTRVLGPGGDSTNYGGRLDWANKNA
BmglvB       KVFGTLGESDQGLFGKGGYNREFFNDDRGKLTGQAYGTRVLGPGGDSTSYGGRLDWANENA
AAG44367.1   KIFGTLGSNDDSVFGRGGYKQDIFNDHRGRLSGQAYGSRVINDYGGSSILGGKLDWSNDNA
              : *****..*:.:**:.**:::***.**:*:*****:**:.  *.*:  **:***:*.**
                    130       140       150       160            170
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
BmglvA2      EAAIDINRQIGGRSGMTATGSGVWDLDKNTRLSAGGMISKEFGHRRPDVGVQAEFRHDW
BmglvA3      EAAIDINRQIGGRSGMTATGSGVWDLDKNTRLSAGGMVSKEFGHRRPDVGVQAEFRHDW
BmglvA5      QAAIDINRQIGGRSGMTASGSGVWDLDKNTHISAGGMVSKEFGHRRPDVGLQAEIRHEW
BmglvA6      QATIDLNRQIGGRSGMTASGSGVWDLDKNTHFSAGGMVSKEFGHKRPDVGLQAEIRHDW
BmglvB       KAAIDLNRQIGGSAGIEASASGVWDLGKNTHLSAGGVVSKEFGHRRPDVGLQAQITHEW
AAG44367.1   RAALDVHKEIGRGSGMKLSGDGVWKLDHNTRFSAGGNLQKNFGHNRPEFGIQGKIEHDF
             .*::*::::**  : *:  :..***.*.:**::**** :.*:***.**:.*:*.:: *::
```

图1　家蚕与粉纹夜蛾中的 Gloverins 的序列比对

Fig. 1　Alignment of amino acid sequences of the Gloverin family members in *Bombyx mori* and *Trichoplusia ni*

用CLUSTAL X（1.8）软件分析，AAG44367.1是来源于粉纹夜蛾的Gloverin抗微生物肽，下划线表示家蚕Gloverins的信号肽序列，虚线表示比对空位，星号代表比对的保守位点。Alignment of amino acid sequences of the Gloverin family members in *Bombyx mori* and in *Trichoplusia ni*（GenBank：AAG44367.1）using CLUSTAL X（1.8）；the underline indicated the signal peptide，while the asterisk indicated the conservative sites.

2.2　RT-PCR 扩增 Gloverins 同系物基因

家蚕化蛹后抽提蚕蛹总RNA，用RT-PCR方法扩增Gloverins目的基因，结果如图2所示，所得的目的基因片段大小与预期一致（*BmglvB*：545 bp；

BmglvA2/A3：533 bp；*BmglvA5*：526 bp；*BmglvA*：525 bp）。将 PCR 扩增获得的目的基因（*BmglvA2/A3* 为 *BmglvA2* 和 *Bmglv-A3* 基因的混合物）分别插入载体 pET-21d 的 *Nco* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 位点，转化 *E. coli* Rosetta™（DE3）宿主菌，对重组插入的目的基因序列进行测序验证，在此分开 *BmglvA2*、*Bmglv-A3* 基因的重组表达菌株，获得重组表达质粒菌株 pET-21d-*BmglvB*（*-A2*，*-A3*，*-A5*，*-A6*）。

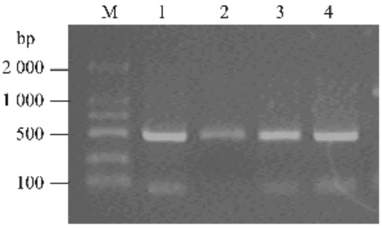


图 2　PCR 扩增家蚕 Gloverins 基因

Fig. 2　PCR products of the five Gloverins in *Bombyx mori*

M：DL2000 marker；1：*BmglvB*；2：*BmglvA2/A3*；3：*BmglvA5*；4：*BmglvA6*.

2.2　家蚕拟 Gloverins 基因的表达

选取鉴定正确的重组菌进行 IPTG 的诱导，由于在重组质粒 pET-21d-*BmglvB*（*-A2*，*-A3*，*-A5*，*-A6*）中，目的基因表达产物的 C 端携带有一个 His-标签，可以用 His·tag 的单克隆抗体进行 Western blotting 的检测。Tricine-SDS-PAGE 和 Western blotting 的检测结果如图 3 所示，与只含有空质粒 pET-21d 的菌体相比，在重组质粒中出现一条明显的差异蛋白条带（箭头所示），用 BandScan 软件分析差异条带分子量大小约为 16 kDa，与家蚕 Gloverins 同系物目的蛋白的相对分子质量理论值（BmglvB：17.2 kDa；BmglvA2：16.7 kDa；BmglvA3：16.7 kDa；BmglvA5：17.3 kDa；BmglvA6：16.8 kDa）基本相符，Western blotting 结果表明这些差异带为目的蛋白条带，说明家蚕 Gloverins 同系物基因在宿主菌中得到了表达。

2.3　诱导表达条件的优化

选取测序正确的重组菌 *E. coli* Rosetta（DE3），分别从菌液起始浓度、IPTG 浓度和诱导时间进行表达条件的优化。图 4，5 和 6 分别示例了 pET-21d-BmglvA3 重组菌在各种优化条件下的电泳检测结果，从图中可以看出：在 37℃的条件下培养，目的基因最适宜的诱导条件为菌液起始 OD_{600} 值为 0.6 时，加入 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 4～5 h。

2.4　融合蛋白的可溶性分析

大量离心收集上述条件下诱导培养的重组菌体，加入细菌裂解液后，进行超声波裂解细胞，离心后分别收集上清和沉淀进行 Tricine-SDS-PAGE 检测。图 7 示例了目的蛋白的可溶性分析结果，从图中可以看出目的蛋白在上清和沉淀中都存在，但绝大部分存在于菌体裂解液的上清中，即主要以可溶性形式表达。

2.5　表达产物的分离纯化

对细菌裂解液的上清用 Ni-NTA 层析柱纯化后进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测。由图 8 例示可以看出，BmglvA3 经 Ni-NTA 亲和层析纯化后，得到了比较纯的目的蛋白。

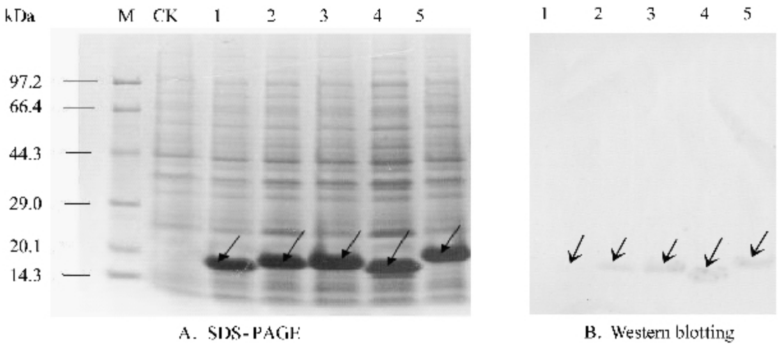


图 3　5 条家蚕 Gloverins 同系物基因表达产物的 SDSP-PAGE 和 Western blotting 检测

Fig. 3　Tricine-SDS-PAGE and Western blotting analysis of expression products of the gloverin-like genes in *Bombyx mori*

M：蛋白质分子量标准 Protein marker of small molecular weight；CK：含有空载体 pET-21d 的表达产物 The expression products of host cells containing pET-21d；1－5：依次为含有重组载体 pET-21d-*BmglvB*（*-A2*，*-A3*，*-A5*，*-A6*）的表达产物，箭头所指的条带即目的蛋白带 The expression products of host cells containing pET-21d-*BmglvB*（*-A2*，*-A3*，*-A5*，*-A6*），respectively. The arrows indicated the resultant bands of target proteins.

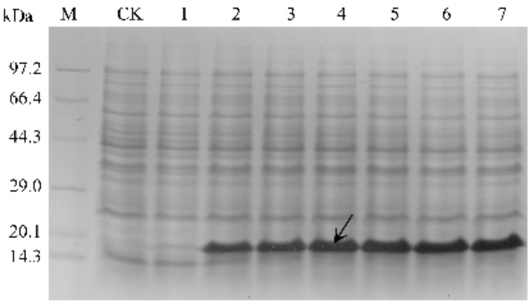


图 4 培养时间对 pET-21d-*BmglvA*3 表达的影响

Fig. 4 Effect of induced time on the expression of pET-21d-*BmglvA*3

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight standard；CK：加入 IPTG 诱导 5 h 的含有空载体 pET-21d 的细菌裂解物 Expression of pET-21d induced for 5 h；1－7：分别表示加入 IPTG 诱导培养 0,1,2,3,3.5,4,5 h 的重组转化子细菌裂解物 Expression of pET-21d-*BmglvA*3 induced for 0，1，2，3，3.5，4 and 5 h，respectively.

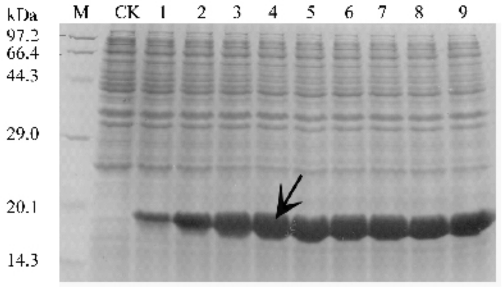


图 5 IPTG 浓度对 pET-21d-*BmglvA*3 表达的影响

Fig. 5 Effect of IPTG concentration on the expression of pET-21d-*BmglvA*3

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；CK：IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 的含空载体 pET-21d 的细菌裂解物 Expression of pET-21d induced by 1.0 mmol/L IPTG；1－9：IPTG 浓度分别为 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6,1.8 mmol/L 的重组转化子细菌裂解物 Expression of pET-21d-*BmglvA*3 induced by IPTG concentrations of 0.2，0.4，0.6，0.8，1.0，1.2，1.4，1.6 and 1.8 mmol/L，respectively.

2.6 表达产物的抗菌活性检测

将经 Ni-NTA 纯化、Sephadex G-10 层析脱盐处理的 Gloverins 冻干样品用 ddH_2O 溶解，将终浓度为 200 μmol/L 的 6 个 Gloverins 同系物蛋白溶液统一稀释到 5 μmol/L，取样品 10 μL，同时以 10 μL 无菌水作为阴性对照，分别加入细菌浓度为 10^7 CFU/mL 的琼脂糖平板孔中。图 9 例示分别为纯化的 5 个 Gloverins 同系物对供试细菌的抑菌效果。结果显示，5 个 Gloverins 同系物对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 无抑制作用，而对灵菌败血菌 *S. marcescens* Bizic、大肠杆菌 *E. coli* $K_{12}D_{31}$、绿脓杆菌 *P. aeruginosa* 等革兰氏阴性菌均有明显的杀菌作用，这与文献报道的在天蚕中发现的抗菌肽 Gloverin 只对革兰氏阴性菌有抑制作用相一致。由此通过抗菌活性的鉴定，证实由家蚕基因组注释发现的 5 个 Gloverins 同系物基因 *BmglvB*（Bmb027709），*BmglvA*2

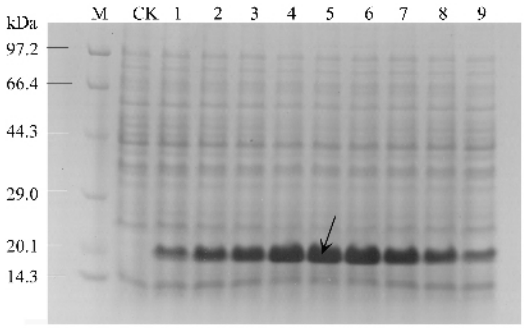


图 6 菌液起始浓度对 pET-21d-*BmglvA*3 表达的影响

Fig. 6 The starting concentration of infection to the expression of pET-21d-*BmglvA*3

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight standard；CK：含空载体 pET-21d 的细菌裂解物（起始浓度 OD_{600} 为 0.6）Expression of pET-21d after being induced at OD_{600} = 0.6；1－9：菌液浓度 OD_{600} 分别为 0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4 时加入 IPTG 的表达细菌裂解物：Expression of pET-21-*BmglvA*3 at the starting concentrations of OD_{600} at 0.2，0.3，0.4，0.5，0.6，0.8，1.0，1.2 and 1.4，respectively.

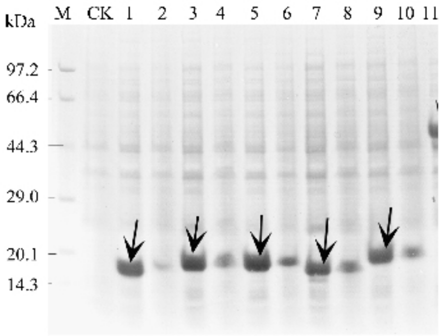


图 7 家蚕 Gloverins 基因在 *E. coli* Rosetta（DE3）宿主菌中表达产物的可溶性分析

Fig. 7 Analysis of the soluble expression of Gloverins in *E. coli* Rosetta（DE3）

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight standard；CK：含空载体 pET-21d 的细菌裂解物 The supernate and the deposits of the crashed pET-21d cell；1，3，5，7，9：分别为含有重组载体 pET-21d-*BmglvB*，*A2*，*A3*，*A5*，*A6* 的细菌裂解液上清 The supernate of the crashed pET-21d-*BmglvB*，*A2*，*A3*，*A5*，*A6* cells；2，4，6，8，10：分别为含有重组载体 pET-21d-*BmglvB*，*A2*，*A3*，*A5*，*A6* 的细菌裂解液沉淀 The deposits of the crashed pET-21d-*BmglvB*，*A2*，*A3*，*A5*，*A6* cells.

（Bmb029116），*BmglvA*3 （Bmb031966），*BmglvA*5（Bmb006180）和 *BmglvA*6（Bmb012754）具有 *Gloverin* 基因的功能。

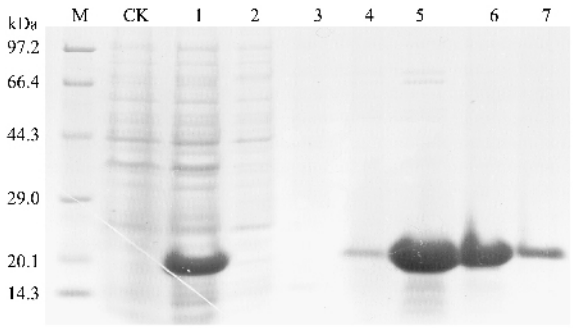


图 8　对克隆表达的 BmglvA3 的 Ni-NTA 亲和层析纯化

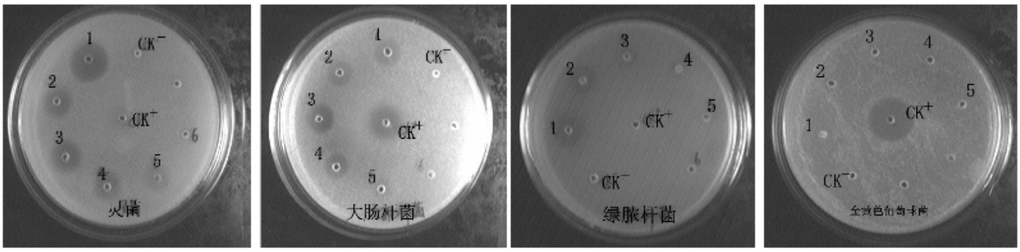
Fig. 8　Purification of BmglvA3 with Ni-NTA affinity chromatography

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight standard；CK：含空载体 pET-21d 的细菌裂解物 The supernate and the deposits of the crashed pET-21d cell；1：超声破碎裂解菌液的上清 The supernate of the crashed pET-21d-*BmglvA*3 cell；2，3：BmglvA3 在 wash buffer 中的洗脱结果 The washed bands in the wash buffer；4－7：BmglvA3 在 elution buffer 中的洗脱结果 The bands of the washed peaks in the elution buffer.

3　讨论

家蚕基因组的全测序于 2004 年完成后，经注释发现了 35 条拟抗微生物肽基因序列，但是新注释发现的这些拟抗微生物肽基因是否具有抗菌活性，是否与其他昆虫中鉴定报道的同种抗菌肽具有相似的抗菌谱和抗菌活性，在同一基因组中的同种抗菌肽的多个同系物基因之间是否存在抗菌差异等问题，则需要通过对这些新注释基因的生物学实验才能确认，这正是完成基因组测序计划后的功能基因组学的研究内容之一。

本文研究选取 5 条家蚕 Gloverins 同系物基因 *BmglvB*，*BmglvA*2，*BmglvA*3，*BmglvA*5、*BmglvA*6，克隆至 pET-21d 载体后转化 *E. coli* Rosetta（DE3）宿主菌，经诱导表达和表达产物的纯化后，采用平板孔穴抑菌法测定这些 Gloverins 同系物的生物活性，结果表明它们具有与在其他昆虫中已鉴定报道的 Gloverin 相似的抗革兰氏阴性细菌的功能，实验确认了它们就是 Gloverin 基因。



灵菌点血菌　*Serratia marcescens* Bizic　　大肠杆菌　*Escherichia coli* $K_{12}D_{31}$　　绿脓杆菌　*Pseudomonas aeruginosa*　　金黄色葡萄球菌　*Staphylococcus aureus*

图 9　克隆表达的家蚕 Gloverins 同系物的抑菌效果

Fig. 9　Antibacterial effect of Gloverin isoforms

CK^+：34 μg/mL Cam；CK^-：无菌水 ddH_2O；1：BmglvB；2：BmglvA2；3：BmglvA3；4：BmglvA5；5：BmglvA6.

另外值得一提的就是家蚕 Gloverins 对绿脓杆菌有一定的杀菌作用。绿脓杆菌是铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*（PA）的俗称，属假单胞菌属 *Pseudomonas*，是一种需氧革兰阴性杆菌，是临床上较常见的外伤感染致病菌之一。PA 致病力极强且对多种抗生素（β 内酰胺类、喹诺酮类、四环素、氯霉素等）易产生耐药性，导致其感染的难治性（顾晓花和沈策，2006）。本试验所选取的绿脓杆菌已经对氯霉素产生了抗药性（图 9），但是家蚕 Gloverins 却对它有较好的抑制效果，这对于研究治愈由绿脓杆菌所引起的外伤感染有着重要的意义。

参 考 文 献（References）

Ausubel FM，Brent R，Kingston RE，Moore DD，Seidman JG，Smith JA，Struhl K（Translated by Jin DY，Yan ZY，Wang HL），1999. Short Protocols in Molecular Biology. Science Press，Beijing. 329－373.［F.奥斯伯，R.布伦特，R.E 金斯顿，D.D 穆尔，J.G 塞德曼，J.A 史密斯，K.斯特拉尔（金冬雁，颜子颖，王海林译），1999. 精编分子生物学实验指南. 北京：科学出版社. 329－373］

Axen A，Carlsson A，Engstrom A，Bennich H，1997. Gloverin，an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora* pupae.

Eur. J. Biochem., 247：614 – 619.

Cheng T, Zhao P, Liu C, Xu P, Gao Z, Xia Q, Xiang Z, 2006. Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Genomics*, 87：356 – 365.

Gu XH, Shen C, 2006. Advances in the study of the effects of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 29(3)：200 – 202. [顾晓花，沈策，2006. 大环内酯类药物对铜绿假单胞菌影响的研究进展. 中华结核和呼吸杂志，29(3)：200 – 202]

Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG, 1980. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, 106：7 – 16.

Lundström A, Liu G, Kang D, Berzins K, Steiner H, 2002. *Trichoplusia ni* gloverin, an inducible immune gene encoding an antibacterial insect protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32：795 – 801.

Mackintosh JA, Gooley AA, Karuso PH, Beattie AJ, Jardine DR, Veal DA, 1998. A Gloverin-like antibacterial protein is synthesized in *Helicoverpa armigera* following bacterial challenge. *Developmental and Comparative Immunology*, 22(4)：387 – 399

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Translated by Jin DY, Li MF, HouYD), 1992. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Science Press, Beijing. 16 – 68, 880 – 897. [萨姆布鲁克 J，弗里奇 EF，曼尼阿蒂斯 T（金冬雁，黎孟枫，侯云德译），1992. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京：科学出版社. 16 – 68，880 – 897]

Seitz V, Clermont A, Wedde M, Hummel M, Vilcinskas A, Schlatterer K, Podsiadlowski L, 2003. Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach. *Developmental and Comparative Immunology*, 27：207 – 215.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25 (24)：4 876 – 4 882.

Xia QY, Zhou ZY, Lu C *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306：1 937 – 1 940.

Xiang ZH, 2003. Silkworm genome project and the silk road in the 21st century in China. *Acta Sericologica Sinica*, 29(4)：321 – 322. [向仲怀，2003. 中国家蚕基因组与 21 世纪丝绸之路. 蚕业科学，29(4)：321 – 322]

Xiang ZH, 2004. The silk road in the 21st century in China. *Acta Sericologica Sinica*, 24(1)：34 – 35. [向仲怀，2004. 21 世纪的丝绸之路. 蚕学通讯，24(1)：34 – 35]

Xu B, Zhou H, Li HZ, Lu YL, Wang LX, Ding GF, 2005. Prokaryotic expression, purification and identification of anti-bacterial peptide gloverin. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 27(6)：529 – 531. [许波，周红，李慧增，鲁永玲，王良喜，丁国富，2005. 抗菌多肽葛佬素的原核表达纯化及活性鉴定. 第三军医大学学报，27(6)：529 – 531]

Yamakawa M, Tanaka H, 1999. Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental and Comparative Immunology*, 23：281 – 289.

Zhu Y, Johnson TJ, Myers AA, Kanost MR, 1995. Identification by subtractive suppression hybridization of bacteria-induced genes expressed in *Manduca sexta* fat body. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33：541 – 559.

（责任编辑：赵利辉）